



TITLE:

尿中カテコールアミンの蛍光定量法について : Euler-Floding法の検討と改良

AUTHOR(S):

杉谷, 章; 由良, 了三

CITATION:

杉谷, 章 ...[et al]. 尿中カテコールアミンの蛍光定量法について : Euler-Floding法の検討と改良. 日本外科宝函 1959, 28(7): 2834-2843

ISSUE DATE:

1959-08-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/206958>

RIGHT:

尿中カテコールアミンの螢光定量法について

—Euler-Floding 法の検討と改良—

京都大学医学部外科第2講座（指導：青柳安誠教授）

杉 谷 章

京都大学医学部精神科（指導：村上 仁教授）

由 良 了 三

〔原稿受付 昭和34年7月23日〕

FLUORIMETRIC DETERMINATION OF CATECHOLAMINES IN URINE

—A CRITIQUE AND OUR MODIFICATION
OF EULER & FLODING'S METHOD—

by

AKIRA SUGITANI

From the 2nd Surgical Division, Kyoto University Medical School
(Director : Prof. Dr. YASUMASA AOYAGI)

RYOZO YURA

The Psychiatric Division, Kyoto University Medical School
(Director : Prof. Dr. Masasi MURAKAMI)

Nowadays, Euler & Floding's fluorimetric method is widely regarded as the most useful for the determination of catecholamines in urine.

We have investigated the recovery and specificity of this method from the clinical and practical standpoint.

1) Recovery: The very insufficient recovery of the original method, 60-80% in Adrenaline (A) and 40-60% in Noradrenaline (NA), was not due to the oxidative decomposition during assay procedure, nor to the loss in purification of urine by alumina adsorption, but due to the insufficient oxidation caused by the inhibitory action of urine eluate. This inhibitory action was stronger to NA than to A. We have succeeded to get rid of the inhibited oxidation by using the so-called internal standard and the diluted eluate, and we obtained satisfactory recovery to NA and A.

2) Specificity: Imaizumi & Sano reported that DOPA existed in normal urine, and that it was one of the fluorescence producing substances, which passed through the tow barriers of this determination method —alumina adsorption and fluorimetric procedure. We obtained the following results in our experiments. DOPA is oxid-

zed under the same condition with NA. This character of DOPA is quite different from that of A. Accordingly, the fluorescence from DOPA is included in that of NA, but the former has no influence on the fluorescence of A in this method.

3) We applied our modified method to the estimation of urinary excretion of NA and A in the following states: (1) normal states, (2) Pheochromocytoma, (3) essential hypertension, (4) insulin hypoglycemia, (5) febrile states, (9) mental changes induced by LSD, (7) various states before and after surgical operations and (8) diurnal variation.

体液中に存在するカテコールアミン、特にアドレナリン(A)、及びノルアドレナリン(NA)の分離定量法のうちで、化学的定量法として現在主に実用化されているのは、Lundにより確立されたTrihydroxyindol-^{1) 2) 3)}螢光測定法、及びWeil-Malherbe & BoneによるEthylenediamine-縮合体螢光測定法である。^{4) 5)}

従来、化学的定量法として、種々の比色定量法(Shaw,⁶⁾ Raab, Euler & Hamburg,⁸⁾ Ozaki, Ghosh,⁹⁾ があつたが、何れも体液中よりの定量法としては感度が低く、且つ非特異的である為、定量の目的には多く生物学的検定法が用いられていた。

螢光測定法は、比色法のかかる欠点を除き、より鋭敏な方法として登場し、特に尿中カテコールアミンの定量には、Lundの方法が主として採用され、種々の改良法が発表された。(Sobel,¹¹⁾ Pekkarinen,¹²⁾ Pitkanen,¹³⁾ Goldenberg et al,¹⁴⁾ Moulton,¹⁵⁾ Johnson,¹⁶⁾ Price & Price,¹⁷⁾ そしてLund法の変法の一つであるEuler & Floding¹⁸⁾ 法は、比較的簡単であり、而も現在最も有用なものと認められている。

吾々もEuler-Floding法を採用し、種々検討したが、此処にその結果と、それに基いて現在実用している我々の改良法について報告する。^{19) 20) 21)} なおLund法については、吾国で既に田坂其他の紹介、今泉、其他の改良法の報告がある。²²⁾

1 Euler-Floding 法原法とその原理

此の方法は、Shaw⁶⁾の発見したカテコールアミンの水酸化アルミウム(又はアルミナ)への特異的な吸着を利用して尿から抽出し、これを赤血塩で酸化してA-及びNA-クロームとし、更にアルカリにより螢光物質であるA-及びNA-ルチンに変え、これをアスコルビン酸で安定化して螢光を測定するものである。AとNAの分離定量には、AはpH 3.5及び6.0に於て共に全量酸化されるが、NAはAに比べて酸化され難く、pH 6.0に於ては全量酸化され、3.5で

はEulerによると約4%しか酸化されないという点が利用される。²³⁾

具体的な実施方法は次の如くである。

(1) 試薬(特に要するもの)

アルミナ(British Drug House製又はMerck製) 100gmを2-N-塩酸1lで20分間煮沸し、更に蒸溜水で酸性のなくなる迄洗い、乾燥密栓して貯える。

Ethylenediamine tetracetic acid (EDTA)

0.25 N-硫酸

10%重炭酸ソーダ

1 Mol 酢酸緩衝液, pH 3.5 と pH 6.0 の二種

0.5% ZnSO₄

0.25%赤血塩

20%苛性ソーダ

2%アルコールビン酸

苛性ソーダアスコルビン酸混合液, 20%苛性ソーダ 4.5cc+2%アスコルビン酸 0.5cc を使用直前に混合する。

(2) 実施法

蓄尿及び精製; 予め塩酸又は硫酸を蓄尿瓶に入れておき、その上に蓄尿して、常に尿を酸性としておく。次いでこの尿を(pH 3.0に調整してから) 10分煮沸して濾過し、此の加水分解した尿100ccにアルミナ2.5g EDTA 1gを加え、強くまぜながら0.5N-苛性ソーダを滴下し、BTB及びTB-紙(pH試験紙)を指標としてpH 8.5とする。これでカテコールアミンはアルミナに吸着される。これを径5cmのガラスフィルターで吸引濾過し、残つたアルミナを10ccの蒸溜水で2回洗い、0.25N-硫酸4.5ccで2回溶出し、溶出液に10%重炭酸ソーダを滴下して、BPBを指標としてpH 4.0とし更に水を加えて10ccとしておく。

酸化及び螢光発生; 試験管I, II, IIIの3本を用意し、IにはpH 3.5 酢酸緩衝液 1.0cc, 溶出液 0.5cc

と 0.5% ZnSO_4 0.4cc を入れて混和し、赤血塩 0.1cc で3分間酸化する。Ⅱには pH 6 の酢酸緩衝液 1.0cc, 溶出液 0.5cc に赤血塩 0.1cc 加えて2分間酸化する。Ⅰ, Ⅱ共に酸化後直ちに苛性ソーダスコルビン酸混合液 1cc を加え蒸留水で 10cc としておく。Ⅲはブランクで、pH 6.0 緩衝液 1cc, 溶出液 0.5cc に苛性ソーダスコルビン酸混合液 1cc を加え、水で 10cc とする。標準液には、0.2 γ NA 又は 0.1 γ A を用い、これを pH 6.0 で酸化して溶出液同様に処理する。此の場合のブランクは、pH 6.0 緩衝液、赤血塩、苛性ソーダスコルビン酸混合液による試薬ブランクを使用するが、以上のものの蛍光測定には、第1フィルターに 400~450 μm , 第2フィルターには 500~800 μm を用いる。此のフィルターによる A と NA の発生する蛍光比は 1.6:1 であり、ⅠはAの全量と NA の約 4%, ⅡはAと NA の蛍光の総和を表す故に、これと標準液の蛍光とを比較して尿中の A 及び NA 量を算出する。

2 吾々の検討

以上述べた Euler-Floding の方法を実際に応用してみると、回収率が低く、Aは60—80%であるがNは40—60%であつた。Pheochromocytoma の診断用としては、これでもいいのであるが、其他の場合の尿中カテコールアミンの微小な増減を知るには全く不十分である。そこで吾々は此の測定法の種々の点について検討したが、その主な点を略述してみよう。

(1) 蓄尿中の A 及び NA の安定性

カテコールアミンはアルカリ性に於て容易に破壊される為、測定の前操作中常にこれによる損失に注意を払わなければならない。Euler によれば、蓄尿に際し塩酸で pH 3 以下にしておけば、尿中 A 及び NA は室温で少なくとも一週間は安定であるとされているが、吾々の経験でも同様であつた。これは元来尿中に含まれている還元物質によるところが大であると思われる。此の物質は後述するように、A 及び NA を測定する時に、酸化を邪魔してその検出をさまたげているのではないかと考えられるところのものである。

(2) 加水分解

尿中カテコールアミンは、一部結合型として排出されているから、加水分解すると測定され得る遊離カテコールアミンは増量する。²⁴⁾

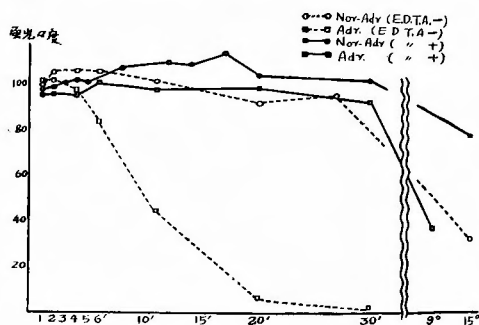
Euler-Floding 原法では尿を小時間煮沸するだけである。併しこれでは不十分であつて、(但し Pheochromocytoma の診断の目的ならこれでもいい。なぜな

ら、此の場合は尿中カテコールアミンは非常に大量であり、かつ遊離型が殆どである故である。) 尿は完全に加水分解する必要がある。Euler は15分ではほぼ完全に分解するといひ、Elmadjian 等は5分で十分であり、15分は長過ぎるとしている。併し吾々の経験ではやはり15分間がよく、これによる損失はみられなかつた。

(3) EDTA について

Euler によれば、EDTAを予め尿に加えると、溶出液の中の NA の pH 3.5 における酸化を押え、A との分離定量を容易にするというが、吾々の検討でも、EDTAを使わない時は、NA は pH 3.5 に於て 20—30% 酸化され、EDTA を加えると 10% 以下に押えられる。A は pH 3.5 に於て ZnSO_4 が存在する場合には、EDTAに関係なく全量酸化される(第4図)。

又次の吸着操作に於て、尿を pH 8.5 とする場合、第1図に示すように、特にAは速に分解するが、E.D.



第1図 pH 8.5 における A, NA の分解曲線。1 γ /dl. NA 及び 2 γ /dl. A-水溶液を pH 8.5 として Magnetic Stirrer でまぜながら、逐時的に Sample をとり 螢光強度を測定。E. D. T. A (+) には 1g/dl を加えてある。

T. A. の存在によつてこれを阻止することが出来る。これはおそらく、尿中に存在する金属イオンと Curate を作り、その酸化作用を除去している為であろう。

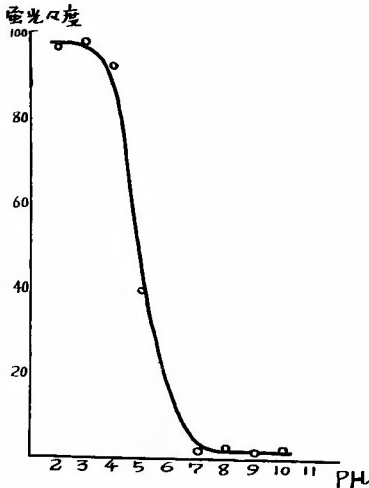
(4) アルミナへの吸着と溶出

Euler & Orwén によれば A 及び NA のアルミナへの吸着及び溶出は極めて定量的に行われ、回収率は大体 70—90% である。

吾々は Merck 製 Brockmann のアルミナ 100g を Weil-Malherbe²⁷⁾ に準じて、2N-塩酸 500cc で 20 分煮沸後、温 2N-塩酸 500cc で洗滌、それを蒸留水で酸

性のなくなる迄洗い、300°C で3時間加熱して活性化し、密栓して貯えて使用している。これによりAは80—90%，Nは70—90%の吸着率が得られる。

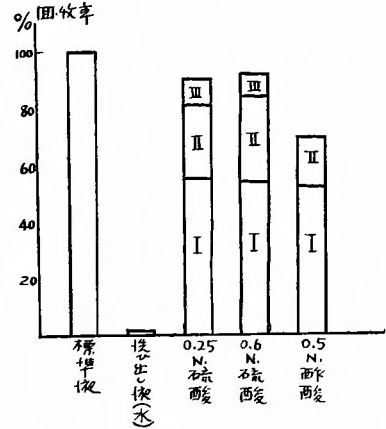
吸着操作として Lund, Weil-Malherbe, Sobel, Johnson³⁾ 等はカラム法を用いているが、吾々は Euler-Floding⁴⁾ の原法に従つて、尿にアルミナを直接投入する方法を採用、即ち、200cc ビーカーに水解した尿100cc を移し、アルミナ 2.5g と EDTA 1g を投入、1% BTB を滴加、Magnetic Stirrer で強く混ぜながら 5N-NaOH を滴下し BTB を先ず青変せしめてから、更に TB紙を指標として pH 8.5 となし、5分間つづけて混ぜるが、此の時の pH 調節は試験紙で十分であり、Weil-Malherbe⁴⁾ のように pH-meter で厳密に行う必要はない(第2図)。これをグラスフイ



第2図 NA のアルミナへの吸着曲線。300 γ /dl NA-水溶液 100cc に EDTA 1g, Alumina 2.5g⁵⁾を加え、pH を 0.5N-NaOH で調整しながら、各 pH でその上清をとり螢光々度をみる。Aでも同様の曲線である。

ルター (11-G-3) を用いて吸引濾過し残つたアルミナを 10cc の蒸留水で2回洗う。この水洗による損失はなく、不純物を除く為に3—4回洗つても差支はない。なお pH 8.5 にしてから、此処迄の操作は、30分以内に行う方がよい(第1図)。

溶出には 0.25 N-硫酸を用い、吾々は後の溶出液の稀釈の関係から 5cc で2回行つてゐる。即ち 0.25N-硫酸 5cc をアルミナに注ぎ、十分に(約2分間位)振盪混和して、アルミナの沈殿するのをまつてゆつくり吸引濾過、これを2回行うのである(第3図)。この



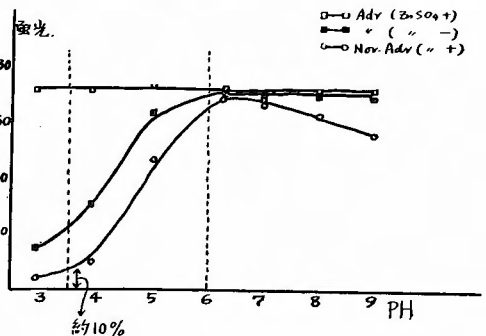
第3図 溶出液の量と種類と回収率。20 γ /dl NA 100cc を Alumina に吸着させ種々の酸で洗ひ出す(1回 4.5cc とし I, II, III とくりかえす。)

溶出液は時に白濁している。Pitkänen¹³⁾によれば、これは無機塩、特に磷酸塩であり、溶出液を重碳酸ソーダで pH 4.0 にすると白濁は消失して、回収率に影響はない。また溶出液は酸性のまま氷室に保存すれば少なくとも2—3日は安定である。

吾々は実際の測定に当つて、10cc の溶出液を BPB を指標として10%重碳酸ソーダで pH 4.0 とし、これを蒸留水で20cc 迄稀釈している。これは後述するように、以後の酸化操作に於て吾々の方法は原法と異り、試料を2分して用いることと、この稀釈により、溶出液の検出阻害作用が減じ、酸化に好都合な為である。

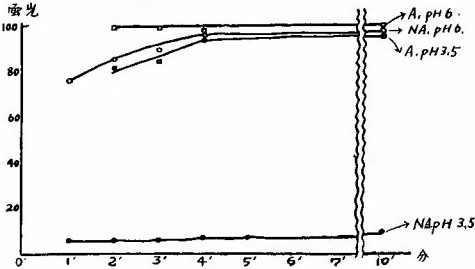
(5) 酸化法について

A 及び NA の各 pH での赤血塩による酸化度は、第4図のようであつた。即ち ZnSO₄ の存在により A



第4図 200 γ dl A 及び NA の各 pH での酸化、pH 3.5 で A は全量酸化、NA は10%酸化されるのみ。(EDTA を使用してある)

は pH 3.5 で全量, NA は6—9 % (10%以下) 酸化され, pH 6.0 では $ZnSO_4$ の有無に関せず A 及び NA は共に全量酸化される。



第5図 各 pH の A 及び NA の酸化時間と蛍光度. pH 3.5 では何れも $ZnSO_4$ 使用してある。

酸化時間の影響は第5図に示したが, 原法では pH 6.0 で2分, pH 3.5 で3分の酸化となつている。併し吾々は pH 6.0 で3分, pH 3.5 で4分と各1分あて延長して行つている。

酸化に於ける試料, 試薬の量, アスコルビン酸²³⁾苛性ソーダ混液の処方²⁶⁾は原法通りとした。

(6) 検出阻害作用について

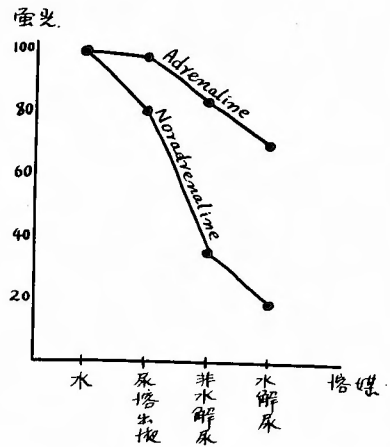
溶出液を赤血塩で酸化し, 更に蛍光を発生させるのであるが, 此の蛍光を原法通り, 標準液である A 又は NA の水溶液と比較すると, 前述したように回収率が極めて低く, 特に NA に於て著しい。これは吾々のみでなく, Sobel, Euler, Pitkanen 等も指摘しているところである。

而も此の回収率の低い原因は, 前述のように吸着操作までの過程にあるとは考えられない。そこで吾々は溶出液自身に A 及び NA の検出を阻害する作用があるものと考え, 同量の蒸留水, 原尿及びその溶出液に, それぞれ同量の A 又は NA を加え, その蛍光を比較した。すると溶出液及び原尿に加えたカテコールアミンの蛍光は, 蒸留水のそれに比べて著しく低く, これが回収率の悪い最大の原因であることを知つた (第6図)。

更に吾々は, この検出阻害作用につき若干の検討を加えて次の結果をえた。

a) 検出阻害作用は, 溶出液, 原尿, 加水分解尿の順に大きくなる。

b) A と NA が阻害を受けて蛍光を減ずる率は, 同一尿では常に NA の方が大きい。A は0—30%, NA は20—60%の蛍光減少を示した。

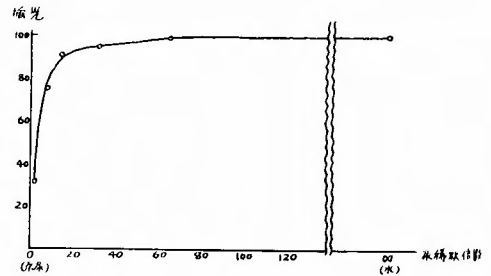


第6図 A 及び NA を種々の溶媒を用いて 50 γ /dl 溶液とし, その発する蛍光強度を比較する。

c) 此の率は同一尿では常に一定である。

d) 尿にカテコールアミンを加えてから加水分解しても, 加水分解した同一尿にカテコールアミンを加えても, 阻害率は変らない。

e) 原尿を水で種々の濃度に稀釈したものに, NA をおのおの等量加えて, それぞれ酸化検出してみると (第7図), 尿の濃度がある程度迄は, 添加 NA の蛍光



第7図 種々の稀釈度の尿を作り, それに NA を同量とかし, 各々を酸化, 蛍光強度をみる。

は稀釈度に大体比例し, それ以上では蛍光はほぼ一定となり, 水溶液のそれと一致する。又酸化剤たる赤血塩を増量すれば, 阻害作用を及ぼす最大濃度が大きくなる。

即ち以上の事実から, 吾々は検出阻害作用は, 酸化阻害によるものではないかと考えているのである。この阻害は NA に強く起り A には少ないが, これは元来 NA が A より酸化されにくいという事実と一致する。

これらのことから、回収率を上げる為には吸着したアルミナを十分洗滌して不純な附着物を除けばいい筈である。実際に、かくして得た溶出液の阻害作用はたしかに減少するが、大量の洗濯水へのカテコールアミンの流失がおこることをここでは考えなければならない。吾々は次に述べるように、実際には溶出液の阻害作用を考慮に入れる必要のない方法を行つていたので、アルミナの蒸留水による洗滌は10cc×2回に止めている。

(7) 標準液について

前述したように溶出液にはそれぞれ固有の検出阻害作用があり、尿によりその阻害作用は異なる為、Euler-Floding 原法、其他諸家の方法のように、NA 又は A の水溶液を標準液として比較したのでは正確な値は得られず、測定値が過少になる事は明かである。そこで吾々は溶出液に直接標準液を溶かす方法、所謂 Internal Standard を用いた。これによつて回収率は主として吸着率のみに左右されることになり、従つて上昇した。

更に A 及び NA の分離定量に際し、諸家は何れも A 又は NA を単独で標準液とし、A と NA の螢光比をあらかじめ測定しておいて、それから他方の螢光を算出している。吾々の検討からすれば、溶出液による検出阻害率は各尿で A と NA は各々異なるのであるから、この様な一方のみを標準として使用し、他方を算出するという事は出来ないことである。そこでかかる検出阻害の相違を除く為、A 及び NA 両者の混合液を標準液として使用した。そしてこれによつて A と NA の螢光比をも考慮に入れる必要はなくなつた。

吾々には実際には次のように行つていたのである。即ち A 及び NA を各々 1000 γ 含む 500cc 溶液(塩酸性としておく)を当日作製して標準液となし、2本の試験管に溶出液を各々 5cc 入れ、此の一方に標準液 0.5cc 即ち A 及び NA を各 1 γ ずつ添加し、他方に蒸留水 0.5cc を添加して、その両者を酸化し比較するのである。

なお標準液作製に際し、厳密には A 及び NA の結晶を一々溶解すべきであるが、吾々は三共製薬の塩酸エピレナミン、ノルアドレナリン注射液を使用した。再三検討の結果、これ等は、標準に十分堪える程正確な濃度であり、又純粋であつた。注射液中の安定剤たる亜硫酸水素ナトリウムは、稀釈によつて影響はなくなつた。

(8) ブランクについて

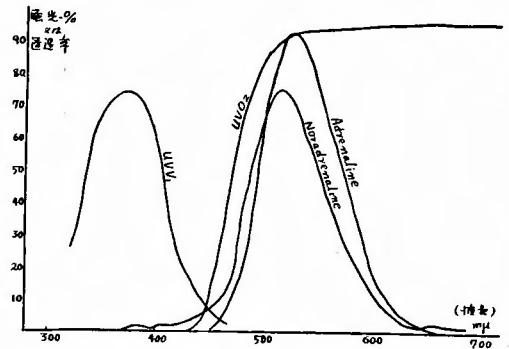
原法の説明で既に述べたように、ブランクには溶出液、緩衝液アスコルビン酸-苛性ソーダの混合液を含み、赤血塩を加えない非酸化型ブランクを吾々もそのまま使用している。併し Lund は溶出液を酸化し、アスコルビン酸を省いて酸化をルチンから更に進めて螢光を消失させた酸化型ブランクを用いている。

試薬ブランクは吾々の方法では作る必要はない。なお此のブランクが時に酸化した試料より、はるかに高い値を示す場合がある。これはどうも被検者が種々の抗生物質、ビタミン等を用いている時に往々起る様であつて、此の問題は解決を要することであるが、十分検討してはいない。

(9) 螢光測定

アスコルビン酸-苛性ソーダ混合液は、作つてから 30—50分の寿命しかないのでこの間に螢光測定を終了する様にす。

此の方法による A 及び NA-ルチンの螢光分布は、第 8 図の如くである(島津-Beckmann 型分光光度計



第 8 図 使用したフィルターの透過率及び A 及び NA ルチンの螢光分布曲線。

の螢光エネルギー分布測定装置による)。即ち NA は 520m μ , A は 530m μ 附近に山がある。

吾々は八木式微量螢光々度計を使用し、最初は励起フィルターとして UVV₁ (max 380m μ)、紫外線吸収フィルターとして UVO₂ (max 500m μ 以上)、撰択フィルターとして FLB₂ (max 520—530m μ) を用いていたが、吾々の測定に於ては 500m μ 以上の盲螢光は存在しない故 FLB₂ を省いて測定している。

3 吾々の改良測定法

以上 Euler-Floding 法を中心として種々検討した結果、実際の測定に当つて吾々が改良した測定方法は次

のようになった。

即ち、Euler-Floding 法のほぼ原法に従つて、蓄尿を行い、15分加水分解、その 100cc をとつて吸着し、0.25N-硫酸 5.0cc×2回 で溶出し、溶出液を pH4.0 とし水で 20cc 迄希釈しておき、更にこの溶出液を 5cc ずつ2本の試験管に分注し、その一方に蒸留水 0.5cc (試料 S_1)、他方に標準液 0.5cc (試料 S_2)を加え、 S_1 、 S_2 を第1表のように 0.5 cc ずつ5本の試験管 (10 cc 目盛附)に入れて、これに表のように緩衝液、 $ZnSO_4$ を加え、更に赤血塩で所定時間だけ酸化する。酸化後は直ちに、直前作つておいたアスコルビン酸-苛性ソーダ混合液を 1.0cc、ブランクも含めて各試験者に加え、水で 10cc としてこの螢光を測定する。

第 1 表

試料 0.5cc	S_1			S_2	
試験管番号	I	II	III	IV	V
酢酸緩衝液 1.0cc	pH 3.5	pH 6.0	pH 3.5 or pH 6.0	pH 3.5	pH 6.0
0.5% $ZnSO_4$ 0.4cc	+	-	-	+	-
赤血塩 0.25% 0.1cc で酸化	4 分	3 分	なし	4 分	3 分
アスコルビン酸-苛性ソーダ混合液 1.0cc	+	+	+	+	+

即ち I, IV は S_1 , S_2 中の A 全量と NA の 10% 量の螢光を示し、II, V は S_1 , S_2 中の A と NA の全量螢光を示し、III はブランクで S_1 , S_2 に共通である。

I, II, IV, V の螢光値から III の螢光を減じたものをそれぞれ a, b, c, d とすると、吸着に使つた尿 100cc 中の NA 及び A は次の様にして算出される。

$$S_1 \text{ 中の NA の螢光} = \frac{10}{9}(b-a) = f_N.$$

$$S_1 \text{ " A " } = b - \frac{10}{9}(b-a) = f_A.$$

$$S_2 \text{ " NA " } = \frac{10}{9}(d-c) = F_N.$$

$$S_2 \text{ " A " } = d - \frac{10}{9}(d-c) = F_A.$$

すると溶出液に加えた $\begin{cases} 1r \text{ の A の螢光} = F_A - f_A = A_N \\ 1r \text{ の NA の螢光} = F_N - f_N = N_S \end{cases}$

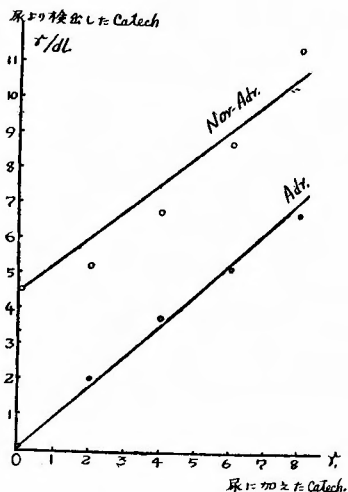
故に溶出液 20cc 中の $\begin{cases} A \text{ の量は} = \frac{f_A}{A_N} \times 1r \times \frac{20}{5} \text{ cc} \\ NA \text{ の量は} = \frac{f_N}{N_S} \times 1r \times \frac{20}{5} \text{ cc} \end{cases}$

即ちこれが尿 100cc 中の量である。

回収実験；吾々の方法によつて尿中に添加した N. 又は A の回収率を測定した結果は第 2 表のようであつた。

第 2 表

Nov-Adveualie			Adveualie		
添加量 r/dl	回収量 r	回収率 %	添加量 r/dl	回収量 r	回収率 %
3.0	2.6	88	3.0	2.3	77
4.0	2.9	73	5.0	3.9	78
5.0	3.5	70	10.0	8.0	80
"	3.8	76	"	8.5	85
"	3.9	78	"	9.0	90
"	4.0	80	"	10.0	100
"	5.0	100			
10.0	7.0	70			
平均 81%			平均 85%		

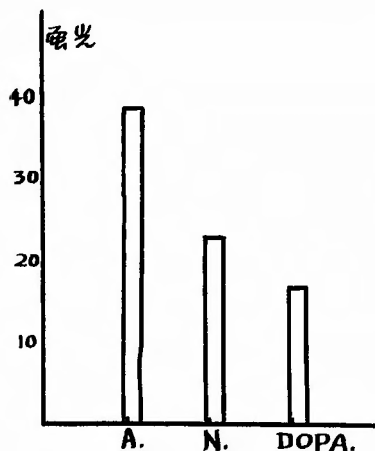


第 9 図 尿 100cc に A 及び NA 等量混合液を加え分離検出した際の回収回線

第 9 図は同一尿に加えた種々濃度の A 及び NA 混合液の回収を示したもので、ほぼ直線状であり、臨床的使用に十分堪える回収率であろう。

特異性について；尿中には種々のカテコールアミンが排出される。NA 及び A の他に此の方法にかかつて来るのは、Euler et al によると Oxytyramine があるが、その螢光は此の方法ではわずかであつて問題にならぬという。併し今泉等は、尿中に DOPA の存在を証明し、²²⁾ 而もそれが A 及び NA に西敵する螢光を発するとした。そこで吾々は此の方法に於ける DO

PA の態度を検討したところ、これは NA と同様に pH 3.5 で約 5%, pH 6.0 で全量が酸化され、而もその螢光の強さは NA の約 60% であつた(第10図)。従つ



第10図 PH 6.0 での A, NA 及び DOPA の発する螢光。

て吾々の方法における NA の値には DOPA も含まれているかもしれないが、此の点は今後検討を要する。但し A の値には DOPA は関係しない。

4 測定例

1) 健康人 1 日の排出量は吾々の方法によれば NA は 20—70 γ , A は 1—5 γ であり, Euler²⁵⁾ の述べている NA 25—50 γ , A 4—8 γ と大体一致する。此の値は測定法により相当差はあるが、生物学的検定法によつての値とも一致している。同一人の尿を連日測定すると、A は略一定値を示すが NA はかなりの変動がある。これは DOPA の混在や、一日の運動量の差にその原因があるのであろう。

2) Pheochromocytoma

著明の増量が証明出来る。此処に一例を示す(第11図)。この増量も腫瘍の摘出で正常にもどつている(第59回外科学会総会で発表)。此の例は NA のみ増量していた例であるが、摘出腫瘍自身のカテコラミン含量も NA = $22 \times 10^3 \gamma/g$, A = $8 \gamma/g$ であつた。

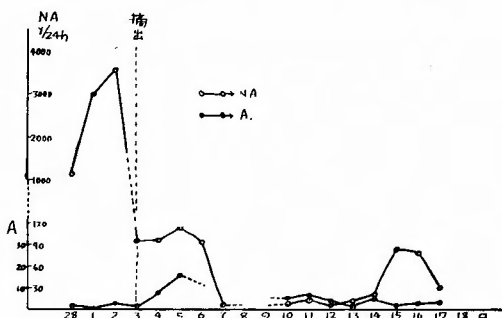
3) 高血圧症

多くの人々が述べている通り、本態性高血圧の場合は正常範囲内にあつた。吾々の例では NA = 22.1 $\gamma/24h$, A = 10.5 $\gamma/24h$ (16例平均) であつた。

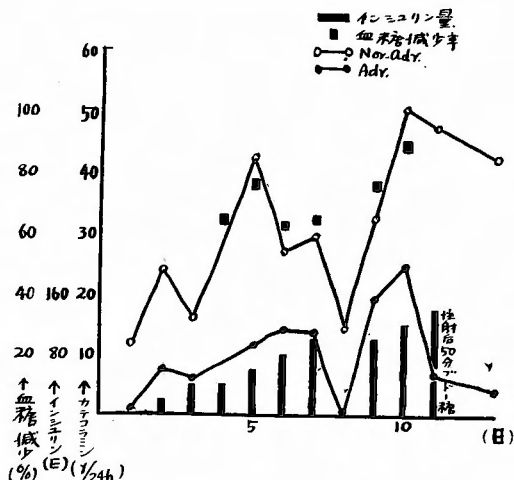
4) インシュリン注射時

インシュリン 4 単位静注による耐性試験、及び精神

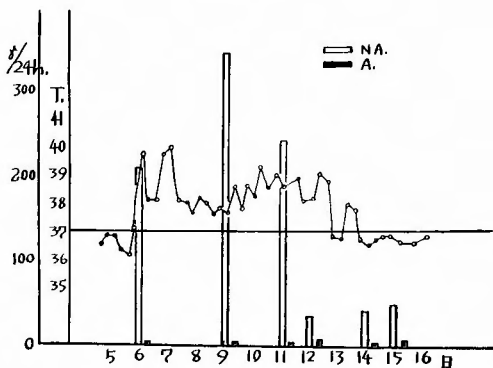
疾患のインシュリン衝撃療法の際に測定し、A の著明な増量を認めた。此処にその一例を示す(第12図)。



第11図 Pheochromocytoma 患者の尿中排出カテコールアミン量(24才)



第12図 Insulin 投与とカテコラミン。34才, Schizophrenie 患者へのインシュリン衝撃療法。



第13図 発熱と A 及び NA 排出量との関係 (61才, 大腸癌)

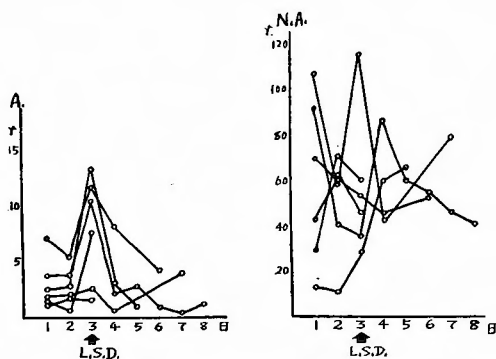
NA は一般に増量するが規則的でない。(第56回精神神経学会総会発表)

5) 発熱時¹⁹⁾

田坂等がすでに発表している通り、NA の増量がある。一例を図示する(第13図)。

6) リゼルゲ酸ジエチルアミド (LSD) 投与時³⁰⁾

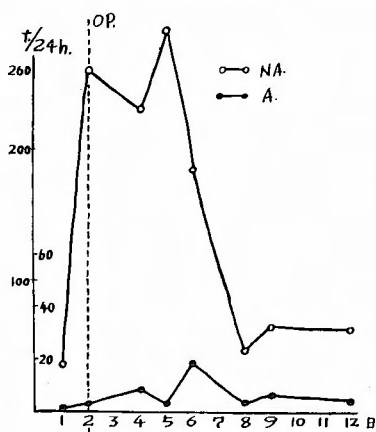
人工精神病惹起物質である LSD を内服又は注射した際、精神症状が多彩なものはAが増量し、精神症状少く、LSD に抵抗性のあるものはAの増量はない。NAに変化はない(第14図)。(第56回精神神経学会総会で発表)



第14図 LSD 内服 (75—125 γ) による A 及び NA 排出量の変化、神経症 4 例、精神分裂症 2 例

7) 外科手術前後³¹⁾

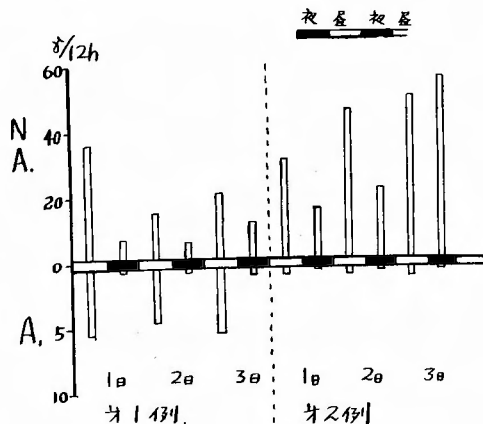
NA の変化が主で術後数日間増量する。但し術後の出血、発熱、ショック等の続くものはその間増量を認める。またAも共に増量する例もある(第15図)。



第15図 胃切除術(癌)前後の尿中排出カテコールアミン。58才男。

8) 昼夜の変化^{32) 33)}

Kärki, Euler et al. がくわしく記載している通り、夜間は A 及び NA 共に分泌量が減少している。吾々の例もその通りであつた(第16図)。



第16図 昼、夜の尿中カテコールアミン量の差。昼は 8⁰ A.M.—8⁰ P.M. 夜は 8⁰ P.M.—8⁰ A.M. としてある。

5 結 論

1) 吾々は尿中カテコールアミン測定法として Euler-Floding 法を採用し、これを種々検討してその結果、若干の改良を加えた。

2) 吾々の改良法は比較的簡単で而も一定の精度を望み得る方法であり、これが臨床的使用に十分耐えるものであることを、若干の臨床例で A 及び NA の変動を測定して確認することができた。

此の測定に協力して頂いた、京大精神科化学研究室の東島功、渡辺宣子、神山勝子の三氏に心から感謝する。

参 考 文 献

- 1) Lund, A.: Fluorimetric Determination of Adrenaline in Blood. I. Isolation of the Fluorescent Oxidation Product of Adrenaline. Acta Pharmacol. et Toxicol., 5, 74, 1949.
- 2) Lund, A.: Fluorimetric Determination of Adrenaline in Blood. II. The Chemical Constitution of Adrenolutine. (The Fluorescent Oxidation Product of Adrenaline.). Acta Pharmacol. et toxicol., 5, 121, 1949.
- 3) Lund, A.: Fluorimetric Determination of Adrenaline in Blood. III. A New Sensitive and Specific Method. Acta Pharmacol. et toxicol. 5, 231, 1949.

- 4) Weil-Malherbe, H., and Bone, A. D.; The Chemical Estimation of Adrenaline-like Substances in Blood. *Biochem. J.* **51**, 311, 1952.
- 5) Weil-Malherbe, H., and Bone A. D.; The Adrenergic Amines of Human Blood. *Lancet.* **264**, 974, 1953.
- 6) Shaw, F. H.: The Estimation of Adrenaline. *Biochem. J.* **32**, 19, 1938.
- 7) Raab, W.: Adrenaline and Related Substances in Blood and Tissues. *Biochem. J.* **37**, 470, 1943.
- 8) Euler, U. S. v. and Hamburg, U.: Colorimetric Estimation of Noradrenaline in the Presence of Adrenaline. *Science*, **110**, 561, 1949.
- 9) 尾崎敏行: Nor-Adrenaline 及び Adrenaline 混合物についての比色定量法並に副腎エキスの応用; *The Tohoku J. of Exper. Med.* **61**, No. 1, 昭29.
- 10) Ghosh, M. C.: Colorimetric Determination of Epinephrine in Blood and Adrenal Gland: *J. of Biol. Chem.* **192**, 867, 1951.
- 11) Sobel, C. and Henry, R. J.: Determination of Catecholamines (Adrenaline and Noradrenaline) in Urine and Tissue. *Am. J. Clin. Path.* **27**, 240, 1957.
- 12) Pekkarinen, A.: Studies on the Chemical Determination, Occurrence and Metabolism of Adrenaline in the Animal Organism. *Acta Physiol. Scand.* **16**, Supp. 54, 1948.
- 13) Pitkänen E.: Studies on the Determination and Excretion of Adrenaline & Nor-Adrenaline in the Urine. *Acta Physiol. Scandinav.* **38**, 130, 1956.
- 14) Goldenberg & Serline: Chemical Screening Methods for the Diagnosis of Pheochromocytoma. *Amer. J. Med.* **16**, 310, 1954.
- 15) Moulton, & Willoughby: A Short screening Test for Pheochromocytoma. *Lancet.* **269** 16, 1955.
- 16) Johnson, R. B.: An Improved Method for the Chemical Determination of Urinary Catechol Amines. *J. Lab. & Clin. Med.* **51**, 956, 1958.
- 17) Price, H. L., Price, M. L.: The Chemical Estimation of Epinephrine and Norepinephrine in Human and Canine Plasma. Critique of Trihydroxyindol Method. *J. Labor. Clin. Med.* **50**, 769, 1957.
- 18) Euler, U. S. v., Floding, I.: Diagnosis of Pheochromocytoma by Fluorimetric Estimation of Adrenaline and Noradrenaline. *Scandinav. J. Clin. & Labor. Invest.* **8**, No. 4, 1956.
- 19) 田坂定孝, 吉植庄平, 山田律爾: 発熱時の神経性因子特に尿中アドレナリン, ノルアドレナリンに関する研究(第1報). *総合臨床*, **6**, 1586, 昭32.
- 20) 田坂定孝, 吉植庄平, 山田律爾: 血中および尿中アドレナリン, ノルアドレナリン測定 of 診断的価値, 特にクローム親和細胞腫について. *診断と治療*, **46**, 昭33.
- 21) 吉植庄平, 清水直客, 山田律爾: カテコールアミンについて. *内科*, **3**, 544, 昭34.
- 22) 今泉, 佐野: カテコラミン定量法の進歩. *日内分泌会誌*, **32**, 932, 1958.
- 23) Euler, U. S. v. & Floding, I.: A Fluorimetric Micromethod for Differential Estimation of Adrenaline and Noradrenaline. *Acta Physiol. Scandinav.*, **33**, 118, 1955.
- 24) Euler, U. S. v., Hellner, S., Excretion of Noradrenaline, Adrenaline, and Hydroxytyramine in Urine. *Acta Physiol. Scandinav.*, **22**, 161, 1951.
- 25) Euler, U. S. v.: Noradrenaline. Charles C. Thomas. Publisher 1956. (田多井, 綱島訳, 協同医書出版社)
- 26) Elmadjian, F., Lamson, E. T., and Neri, R.: The Nature of Adrenaline and Noradrenaline in Normal Human Urine. *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, **16**, 216, 1956.
- 27) Euler, U. S. v., & Orwén: Preparation of Extracts of Urine and Organs for Estimation of Free and Conjugated Nor-Adrenaline and Adrenaline. *Acta Physiol. Scandinav.*, **33**, 118, 1955.
- 28) Euler, U. S. v. and Ström, G.: Present Status of Diagnosis and Treatment of Pheochromocytoma. *Circulation*, **XV**, 5, 1957.
- 29) Euler, U. S. v., Hellner, S., and Purkhold, A.: Excretion of Noradrenaline in Urine in Hypertension. *Scandinav. J. Clin. & Labor. Invest.*, **6**, 54, 1954.
- 30) Elmadjian, F. et al: Excretion of Epinephrine and Norepinephrine under Stress. Recent Progress in Hormone Research, Volume XIV. 1958.
- 31) Franksson, C., Gemzeli, C. A., And Euler, U. S. v.: Cortical and Medullary Adrenal Activity in Surgical and Allied Conditions. *J. Clin. Endocrinol.*, **14**, 608, 1954.
- 32) Kärki: The Urinary Excretion of Noradrenaline and Adrenaline in Different Age Groups, its Diurnal Variation and the Effect of Muscular Work on it. *Acta Physiol. Scandinav.*, **39**, 132, 1957.
- 33) Euler, U. S. v., Hellner, S., Björkman, & Orwén: Diurnal Variation in the Excretion of Free and Conjugated Noradrenaline and Adrenaline in Urine from Healthy Subjects. *Acta. Physiol. Scandinav.*, **33**, 118, 1955.